DIE HÄMOLYTISCHE WIRKUNG VON CYCLAMIN-CHOLESTERIN-MISCHUNGEN

INAUGURAL-DISSERTATION

ZUR

ERLANGUNG DER DOKTORWÜRDE

DER NATURWISSENSCHAFTLICH-MATHEMATISCHEN FAKULTÄT

DER ALBERT-LUDWIGS-UNIVERSITÄT ZU FREIBURG

IM BREISGAU VORGELEGT

VON

HERMANN LUMMERZHEIM

AUS FORST (LAUSITZ)

UPPSALA UND STOCKHOLM

ALMQVIST & WIKSELLS BUCHDRUCKEREI-A.-G.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41545318_0027

DIE HÄMOLYTISCHE WIRKUNG VON CYCLAMIN-CHOLESTERIN-MISCHUNGEN

INAUGURAL-DISSERTATION

ZUR

ERLANGUNG DER DOKTORWÜRDE

DER NATURWISSENSCHAFTLICH-MATHEMATISCHEN FAKULTÄT
DER ALBERT-LUDWIGS-UNIVERSITÄT ZU FREIBURG
IM BREISGAU VORGELEGT

ACAD.
LUGD.BAT.
BIBL.

VON

HERMANN LUMMERZHEIM
AUS FORST (LAUSITZ)

UPPSALA UND STOCKHOLM
ALMQVIST & WIKSELLS BUCHDRUCKEREI-A.-G.

DEKAN:

GEH. HOFRAT. PROF. DR. STICKELBERGER

REFERENT:

PROF. DR. L. GATTERMANN

Sonderdruck aus:

Meddelanden från K. Vetenskapsakademiens Nobelinstitut

Band 2. N:o 28

UPPSALA 1913

ALMQVIST & WIKSELLS BUCHDRUCKEREI-A.-G.

Inhalt.

Einleitung.
I. Bestimmung des Dissoziationsgleichgewichtes auf hämolytischem Wege.
II. Herstellung der Blutlösungen.
III. Das Ansetzen der Versuche.
IV. Bestimmung des Hämolysegrades mit dem Colorimeter von AUTENRIETH und KÖNIGSBERGER.
V. Die Versuchsresultate.
VI. Besprechung der Resultate.
Zusammenfassung.

Die vorliegende Arbeit soll einen Beitrag zur Kenntnis der Vorgänge liefern, die sich bei der Neutralisation der Toxine durch Antitoxine abspielen. Sie enthält die Resultate einer Reihe von quantitativen Untersuchungen, die ich über die Fähigkeit des Cholesterins, die hämolytische Wirksamkeit von Saponinen herabzusetzen, angestellt habe.

Diese antihämolytische Wirkung den Cholesterins wurde zuerst 1901 von RANSOM[1] beobachtet. WINDAUS[2] stellte 1908

[1] Deutsche med. Wochenschrift *1901*, 194.

[2] Ber. d. deutschen chem. Gesellschaft *42* 238 (1909).

chemisch wohl charakterisierte »Molekularverbindungen» zwischen Cholesterin und verschiedenen Saponinen her und zeigte, dass die Bildung solcher Komplexverbindungen ausreiche, die entgiftende Wirkung des Cholesterins auf Saponine zu erklären, da »das Saponin in der Komplexverbindung tatsächlich entgiftet ist und nicht mehr das höchst energische hämolytische Vermögen besitzt, das dem freien Saponin zukommt.»

Dass es sich bei diesem Vorgange um ein Analogon der Toxin-Antitoxinbindung handelt, ist besonders von MADSEN[1] und ARRHENIUS[2] betont worden. Auf die grosse Rolle, die Massenwirkungsgesetz und Reversibilität bei diesen Bindungen spielen, hat hauptsächlich ARRHENIUS (l. c.) hingewiesen. Er hat an vielen Beispielen gezeigt, dass bei der Entgiftung von Toxinen durch Antitoxine die Verhältnisse genau so liegen, wie man sie bei Annahme einer reversiblen Umsetzung nach den Gesetzen der physikalischen Chemie erwarten sollte.

Ein exakter Nachweis für das Vorhandensein einer dissoziierten Toxin-Antitoxinverbindung ist indessen mit grossen Schwierigkeiten verbunden, weil die in Frage kommenden Stoffe nach ihrer chemischen Natur so gut wie unbekannt sind. Dagegen hat ARRHENIUS gezeigt, dass man umgekehrt mit Hilfe physiologischer Methoden die Konstante eines physikalisch-chemischen Dissoziationsgleichwichtes bestimmen kann, und dies für die Neutralisation von Ammoniak durch Borsäure durchgeführt. Er fand aus der hämolytischen Wirksamkeit von Ammoniak-Borsäuregemischen den Wert $k = 1{,}02$, der später von LUNDÉN auf rein physikalisch-chemischem Wege mit $k = 1{,}04$ bestätigt wurde.[3]

Da nun nach den Ergebnissen der erwähnten WINDAUS'schen Arbeit die Annahme einer Dissoziation der gelösten Saponincholesteride sehr nahe liegt, so habe ich eine Reihe von Versuchen angestellt, die Dissoziationskonstante einer solchen Komplexverbindung aus der hämolytischen Wirksamkeit verschiedener Saponin-Cholesteringemische zu bestimmen. Ich habe dazu das Cyclamincholesterid gewählt, weil Cyclamin verhältnismässig leicht in reinem Zustande zu erhalten ist. Ausserdem lässt sich Cyclamincholesterid schon durch Ätherextraktion in

---

[1] MADSEN u. NOGUCHI, Oversigt Danske Vidensk. Selsk. Förh. *1904*, 457.

[2] Imunnochemie, Leipzig 1907.

[3] Meddel. f. Vet.-Akads. Nobelinstitut Bd. 1, 10. Zeitschr. f. physik. Chemie *44* 7 (1903).

seine Bestandteile zerlegen, sodass bei ihm die Annahme einer Dissoziation besonders naheliegt.

I. Bestimmung des Dissoziationsgleichgewichtes auf hämolytischem Wege.

Unter der Annahme, dass Cyclamin und Cholesterin nach der Gleichung

$$C_{27}H_{46}O + C_{36}H_{56}O_{18} \rightleftarrows C_{63}H_{102}O_{19}$$

1 Mol. Cholesterin + 1 Mol. Cyclamin $\rightleftarrows$ 1 Mol. Cyclamincholesterid.

miteinander reagieren, erhält man als Massenwirkungsgleichung

$$k = \frac{a \,.\, b}{c},$$

worin a und b die Mengen freien Cyclamins und Cholesterins, c die Menge der gebildeten Komplexverbindung, sämtlich in Äquivalenten gemessen, bedeuten.

Um a, b und c aus dem Hämolysegrade zu bestimmen, wurde folgendermassen verfahren.[1]

In eine Reihe von Versuchsröhren wurden eine konstante Menge isotonischer Cyclaminlösung und wechselnde Mengen einer kolloidalen Lösung von Cholesterin in Wasser eingefüllt, dazu so viel 0,9 %-ige Chlornatriumlösung, sodass das Gesamtvolumen in jedem Röhrchen 5 ccm betrug. Nach einiger Zeit wurde die hämolytische Wirkung dieser Mischung gegen eine bei allen gleiche Menge Blutkörperchen bestimmt. Gleichzeitig und unter sonst ganz gleichen Bedingungen wurde eine Vergleichsreihe angesetzt, die wechselnde Mengen Cyclamin ohne Cholesterin enthielt. Bei allen Versuchen wurden auf Grund von Vorversuchen die Konzentrationen so gewählt, dass der erhaltene Hämolysegrad zwischen 5 % und 95 % lag. Dann wurde eine gleiche Versuchsreihe mit anderer Cyclaminkonzentration angesetzt u. s. f.

Der Wert von k wurde nun für jeden einzelnen Versuch folgendermassen bestimmt. Der Hämolysegrad gab die Menge

[1] Die technischen Einzelheiten sind unten ausführlicher beschrieben (Kap. 3).

des freien Cyclamins a an (aus der Vergleichsreihe zu entnehmen). Die Menge des gebundenen Cyclamins ergibt sich als Differenz der zugesetzten Cyclaminmenge A und der freien Cyclaminmenge a, also $A - a$. Damit äquivalent sind die Menge des gebundenen Cholesterins $B - b$ und die der gebildeten Komplexverbindung c. Die Menge des freien Cholesterins ist die Differenz aus derjenigen des insgesamt zugesetzten, B, und der des gebundenen Cholesterins. Solange wir also alles in Äquivalenten messen, können wir schreiben

$$k = \frac{ab}{c} = \frac{a[B - (A - a)]}{A - a}.$$

Zwei Voraussetzungen, die dieser Ableitung zugrunde liegen, seien hier schon kurz besprochen.

Es wurde angenommen, dass das zugesetzte Cholesterin sich in der physiologischen Kochsalzlösung löst. Diese Annahme liegt nahe wegen der grossen Verdünnung, in der ich arbeitete. Die grösste Menge, die von mir verwandt wurde, war 0,5 ccm der 0,01 %-igen Cholesterinlösung = 0,00005 g in 5 ccm Kochsalzlösung (Versuchsreihe 17). Das entspricht einer Konzentration von 10 mgr im Liter, wobei noch nicht berücksichtigt ist, dass ja nur ein Teil des Cholesterins als solches bestehen blieb, während c:a $^1/_3$ von Cyclamin gebunden wird. Ausserdem wurde niemals eine Ausfällung des Cholesterins nach Zusatz der Kochsalzlösung beobachtet, wie sie bei einer kolloidalen Lösung zu erwarten wäre. Sollte andererseits unsere Annahme falsch sein und nur ein Bruchteil des Cholesterins sich lösen, so hätten wir es stets mit einer an Cholesterin gesättigten Lösung zu tun; die Menge des gelösten freien Cholesterins wäre konstant, damit auch der Wert

$$\frac{a}{A - a}.$$

Dagegen müsste der Wert von

$$k = \frac{a\,[B - (A - a)]}{A - a}$$

mit zunehmendem B ebenfalls zunehmen. Aus den Resultaten der Versuchsreihe 17, bei der die Cholesterinkonzentration am

grössten war, geht hervor, dass diese Annahme falsch ist. Wir finden dort eine Serie von Versuchen, für die $B = 5$, und eine zweite, für die $B = 10$ ist. Die unter k verzeichneten Werte sind unabhängig von B innerhalb der Versuchsfehler konstant. Für $a/(A - a)$ dagegen finden wir, dass bei $B = 5$ Schwankungen von 3,1—4,2 (Mittel: 3,9), bei $B = 10$ Schwankungen von 1,3—2,1 (Mittel: 1,8) vorhanden sind. Also: deutliche Abhängigkeit von B.

Wir dürfen also annehmen, dass sich das zugesetzte Cholesterin in der Tat löst.

Ferner wurde angenommen, dass zwei Versuchsröhrchen, die die gleiche Menge freies Cyclamin enthalten, auf Zusatz einer gleichen Blutkörperchenmenge auch denselben Hämolysegrad ergeben, ohne Rücksicht darauf, ob und wieviel Cyclamincholesterid zugegen ist. Zunächst also soll das Cyclamincholesterid selbst nicht merklich hämolytisch wirken. Wäre diese Annahme falsch, so würden wir aus dem zu hohen Hämolysegrade einen zu grossen Wert für a erhalten, und der Wert für k müsste mit zunehmender Konzentration der Komplexverbindung deutlich wachsen, wovon in unseren Versuchsreihen nichts zu merken ist. Ausserdem muss man annehmen, dass durch den Vorgang der Hämolyse kein Cyclamin »verbraucht» wird; diese Annahme ist durchaus nötig, wenn man mit der Zugrundelegung des Massenwirkungsgesetzes nicht in Widerspruch zu der Tatsache einer Entgiftung selbst geraten will. Würde durch die Hämolyse freies Cyclamin verbraucht, so müsste dafür aus der Komplexverbindung neues abdissoziieren, damit das Dissoziationsgleichgewicht gewahrt bleibe, und dieser Vorgang würde sich so lange wiederholen, bis entweder völlige Hämolyse eingetreten, oder alles vorhandene Cyclamin verbraucht ist. Das Cholesterin könnte dann höchstens die Reaktionsgeschwindigkeit herabsetzen. Damit steht aber die Erfahrung in Widerspruch. Wenn man Blutkörperchen zu einem Cyclamin-Cholesteringemisch hinzusetzt, so kommt die Hämolyse nach 2—3-stündigem Stehen bei 37° zum Stillstand, obwohl die Gesamtmenge des vorhandenen Cyclamins zur Hervorbringung eines viel höheren Hämolysegrades ausreichen würde.

II. Herstellung der Blutlösungen.

Für meine Versuche dienten Suspensionen von Ochsenbluterythrocyten in 0,9 %-iger Kochsalzlösung, bei denen die Konzentration der Blutkörperchen den zehnten (= 10 %-ige Blutlösung) oder den zwanzigsten (= 5 %-ige Blutlösung) Teil derjenigen des normalen defibrinierten Blutes betrug. Wo das Serum entfernt wurde, geschah dies in der üblichen Weise durch Zentrifugieren. Das Blut wurde mit dem doppelten Volumen physiologischer Kochsalzlösung gemischt und zentrifugiert, und die darüber stehende Kochsalzlösung abgesogen und gemessen. Sie betrug über 15 mal soviel als die zurückbleibende Flüssigkeitsmenge, sodass also schon nach einmaliger Wiederholung dieser Prozedur über 99 1/2 % des vorhandenen Serums entfernt waren. Die zurückbleibende Blutkörperchenemulsion wurde dann mit physiologischer Kochsalzlösung auf das 10- bezw. 20-fache Volumen der ursprünglichen Blutmenge verdünnt.

Bei der kolorimetrischen Bestimmung des Blutfarbstoffs spielt die Verfärbung der Blutlösungen ins Violette eine sehr unangenehme Rolle; sie stammt wahrscheinlich von bakterieller Zersetzung her. Ich habe vom Zusatz von Desinfektionsmitteln abgesehen, um jede Beeinflussung der hämolytischen Resultate möglichst zu vermeiden. Dagegen habe ich bei der Herstellung der Blutlösungen auf grosse Sauberkeit und sorgfältige Vermeidung von Infektion Wert gelegt. Das Blut wurde, wie es beim Schlachten aus der Wunde floss, in einer mit Glassplittern beschickten, sorgfältig gereinigten Flasche aufgefangen und durch Schütteln defibriniert. Alle Gefässe, mit denen es in Berührung kam, wurden durch mehrstündiges trockenes Erhitzen auf 100°, die verwandte Kochsalzlösung durch Kochen sterilisiert. Vor dem Zentrifugieren wurde es durch sterilisiertes Filtrierpapier filtriert. Nach der Fertigstellung wurde die Blutlösung in Eiswasser gestellt und darin aufbewahrt, sodass ihre Temperatur stets 2—4° C. betrug. So behandelt zeigt sie auch nach 3-wöchentlichem Stehen noch keine Violettfärbung, dagegen stets etwas Selbsthämolyse, die bei frischen Lösungen 3—4 %, bei 8 Tage alten 7—10 % betrug.

III. Das Ansetzen der Versuche.

Die verwandte physiologische Kochsalzlösung enthielt 0,9 % Natr. chlorat. puriss. fusum p. anal. Merck, in destilliertem Wasser gelöst.

Cyclamin und Cholesterin wurden in Form von Lösungen verwandt. Als Molekulargewichte wurden für Cyclamin 776,6, für Cholesterin 386,5 zu Grunde gelegt (WINDAUS l. c.). Das Verhältnis dieser Zahlen ist sehr nahe 1: 2.

Als Cyclaminpräparat diente Cyclamin. cryst. Merck. Es wurde 3 mal aus 85 %-igem Äthylalkohol umkristallisiert und im Vakuum über konz. Schwefelsäure getrocknet. Die verwandten Lösungen enthielten 0,001 %, in einigen Fällen auch 0,01 %, gelöst in 0,9 %-iger Kochsalzlösung.

Cholesterin wurde in Form von kolloidalen Lösungen verwandt. Als Präparat diente ein von Herrn Prof. WINDAUS freundlichst zur Verfügung gestelltes Cholesterin, das noch 2 mal aus Äthylalkohol umkristallisiert wurde. 0,5 g davon wurden in 100 ccm absolutem Alkohol gelöst. 5 ccm dieser Lösung wurden in 500 ccm destilliertes Wasser unter kräftigem Umschütteln schnell eingespritzt, die entstehende Lösung sofort filtriert und in einer Stöpselflasche meherer Stunden auf 90—100° erhitzt. Sie ist dann 2—3 Wochen haltbar ohne Ausflockung zu zeigen. Reinheit des destillierten Wassers ist dafür eine wichtige Vorbedingung. Zu einigen Versuchsreihen wurden auch 0,01 %-ige Cholesterinlösungen verwandt.

Der Cholesteringehalt dieser Lösungen wurde mehrmals nachgeprüft, indem 100 ccm in einem zur Gewichtskonstanz getrockneten Bechergläschen bei 95° eingedampft wurden. Der Rückstand betrug 0,0050 g (0,0048 g, 0,0050 g, 0,0051 g).

Der osmotische Druck dieser alkoholischen kolloidalen Cholesterinlösungen ist nun erheblich geringer als der des Blutes. Darum und wegen des Alkoholgehaltes sind sie selbst hämolytisch wirksam. Ich habe mich stets durch Kontrollversuche davon überzeugt, welche Mengen einer solchen Lösung ohne Cyclaminzusatz eben eine wahrnehmbare Hämolyse meiner Blutlösung hervorriefen. Die für meine Versuche angewandten Mengen blieben stets weit unter der Hälfte dieses Wertes.

Die Versuchsreihen wurden nun folgendermassen angesetzt. Die Versuchsröhrchen — zylindrische Röhrchen von ca. 15 cm

Länge und 10,0—10,4 mm innerem Durchmesser — wurden mit den erforderlichen Cyclamin- und Cholesterinmengen und mit soviel Kochsalzlösung beschickt, dass das Gesamtvolumen überall 5 ccm betrug. Diese Mischung stand dann mindestens 3 Stunden im Trockenschrank bei 37°, damit sich das zu dieser Temperatur gehörige Reaktionsgleichgewicht des Systems: Cyclamin + Cholesterin ⇄ Cyclamincholesterid vollständig einstelle. Gleiche Versuchsreihen, bei denen diese Frist einmal 2 Stunden, das andere Mal 24 Stunden betrug, zeigten gleiche Resultate. Darauf wurden in jedes Rörchen 5 ccm der gut durchgeschüttelten und noch einmal filtrierten Blutlösung mit einer Pipette eingespritzt und die Mischung schnell geschüttelt. Sie stand dann 3 Stunden bei 37°, wieder unter häufigem Umschütteln, darauf über Nacht im Eisschrank zum Absitzen. Die in der überstehenden klaren Lösung enthaltene Hämoglobinmenge wurde kolorimetrisch bestimmt.

IV. Bestimmung des Hämolysegrades mit dem Colorimeter von Autenrieth und Königsberger.

Das übliche Modell des Colorimeters von AUTENRIETH und KÖNIGSBERGER[1] gestattet die Bestimmung des Hämolysegrades mit einer grösseren Genauigkeit, als für unsere Versuche erforderlich ist, hat aber den Nachteil, dass man die zu untersuchende Lösung in die Cuvette umfüllen muss; ein schnelles Arbeiten, wie es bei hämolytischen Versuchen zu wünschen ist, wird dadurch sehr erschwert. Wir haben den Apparat daher etwas abgeändert; an die Stelle der Cuvette trat ein Halter, in den unser Versuchsröhrchen selbst gesteckt wurde. Er liess sich so verstellen, dass sich bei einem mit 10 ccm Blutlösung gefüllten Röhrchen der oberste Teil der Flüssigkeitsäule unmittelbar vor der Doppelplatte befand. Der Winkel der Doppelplatte wurde so gewählt, dass die Projektion des mittleren Röhrchens ohne Zwischenraum neben der des Keiles zu sehen war. Die Krümmung des Röhrchens und die damit verbundene Ungleichmässigkeit der Schichtdicke ist dann so gering, dass

[1] Münchner Med. Wochenschr. *1910*, S. 998.

sie vernachlässigt werden kann: das linke Gesichtsfeld erscheint ganz gleichmässig gefärbt.[1]

Keil und Skala des Apparates wurden folgendermassen geaicht. Eine 10 %-ige Blutlösung wurde mit dem gleichen Volumen einer 0,1 %-igen Cyclaminlösung gemischt und auf 37° erwärmt. Nach wenigen Minuten ist vollständige Hämolyse eingetreten. Von der erhaltenen Lösung wurde ein Teil in den Keil gefüllt; ferner wurden je 0,5, 1, 2, 3, u. s. w., ccm davon in die Versuchsröhrchen gefüllt und mit so viel Wasser versetzt, dass das gesamte Volumen überall 10 ccm betrug. Die erhaltenen Hämoglobinkonzentrationen wurden als 5, 10, 20, 30 u. s. w. prozentige Hämolyse bezeichnet und im Colorimeter die dazu gehörigen Skalenwerte ermittelt. Man erhält aus diesen Werten durch einfache Rechnung oder auf graphischem Wege eine Formel, nach der sich der Hämolysegrad als lineare Funktion des abgelesenen Skalenwertes darstellt, von der Form

$$H = aS + b,$$

worin H und S Hämolysegrad und Skalenwert, a und b Konstanten bedeuten, die bei Verwendung von Röhrchen gleichen Durchmessers und desselben Colorimeters für den Keil charakteristisch sind. Zeichnet man die Funktion als gerade Linie in Koordinatenpapier ein, so kann man den zu jedem Skalenwert gehörigen Hämolysegrad ohne weiteres ablesen.

Die als »100 %-ige Hämolyse» in den Keil gefüllte Vergleichslösung wurde stets mit der Versuchsreihe, für deren Bestimmung sie dienen sollte, frisch angesetzt. Hämolysiert wurde sie mit einem grossen Überschuss von Cyclamin.[2] Zur Bestimmung von Hämolysegraden unter 20 % wurde sie mit dem vierfachen Volumen Wasser verdünnt.

Ein besonderer Vorzug des Colorimeters besteht darin, dass man die Hämoglobinkonzentration nur im obersten Zentimeter des Versuchsröhrchens misst, der nach verhältnismässig kurzer Zeit frei von schwebenden Blutkörperchen ist. Nötig ist nur,

---

[1] Ein derartig abgeändertes Colorimeter eignet sich vorzüglich zur Bestimmung des Hämolysegrades. Es kann von der Firma Hellige & Co, Freiburg i. Br. Albertstr. unter dem Namen Hämolyse-Colorimeter bezogen werden.

[2] Nimmt man statt dessen destilliertes Wasser, das ein paar Tage über pulverisiertem Thymol gestanden hat, so erhält man eine ziemlich haltbare Keillösung. Ich habe sicherheitshalber davon keinen Gebrauch gemacht, zumal mir Blutlösung stets in genügenden Mengen zur Verfügung stand.

die Röhrchen kurz vor dem Einsetzen in den Eisschrank noch einmal umzuschütteln damit, sich das freie Hämoglobin im ganzen Röhrchen gleichmässig verteilt.

V. Die Versuchsresultate.

A und *B* bedeuten die angewandten Cyclamin- und Cholesterinmengen. Die dabei angegebenen Zahlen sind als ccm einer 0,001 %-igen Cyclaminlösung bezw. einer damit äquivalenten 0,0005 %-igen Cholesterinlösung zu verstehen. Wo Lösungen anderer Konzentration verwandt wurden, wurden sie stets entsprechend umgerechnet.

H bedeutet den Hämolysegrad in Prozenten.

a bedeutet »freies Cyclamin» und wurde aus dem Hämolysegrade und der Vergleichsreihe (durch graphische Interpolation) bestimmt.

Unter einer 5 %-igen Blutlösung ist eine solche zu verstehen, bei der die Konzentration der Erythrocyten den zwanzigsten Teil von derjenigen des normalen defibrinierten Blutes betrug.

a) *Hämolyse durch Cyclamin ohne Cholesterinzusatz.*

Den typischen Verlauf der Abhängigkeit des Hämolysegrades von der zugesetzten Cyclaminmenge stellt folgende Versuchsreihe dar:

A	0	5	6	7	8	8,5	9	9,5	10	10,5
H	6	6	6	7	7,5	8	11	13,5	16	19
A	11	11,5	12	12,5	13	13,5	14,5	15	16	18
H	29	39	44	51	62	79	86	90	93	99

Die Blutlösung war 10 %-ig, 6 Tage alt; Serum nicht entfernt (Abb. 1).

Bei Verwendung von serumfreien Blutlösungen bleibt der Vorgang im Prinzip derselbe, es genügen aber geringere Cyclaminmengen. Ich habe mehrmals aus ein und derselben Blutprobe 2 Lösungen hergestellt, von denen die eine von Serum befreit war, die andere nicht, um die antihämolytische Kraft des Serums zu messen. Die Resultate sind in der folgenden

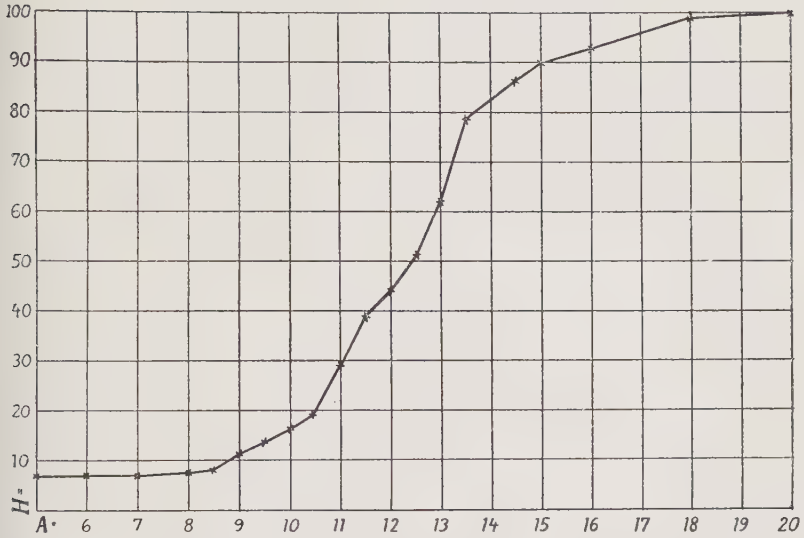

Abb. 1. Abhängigkeit des Hämolysegrades von der Cyclaminkonzentration.

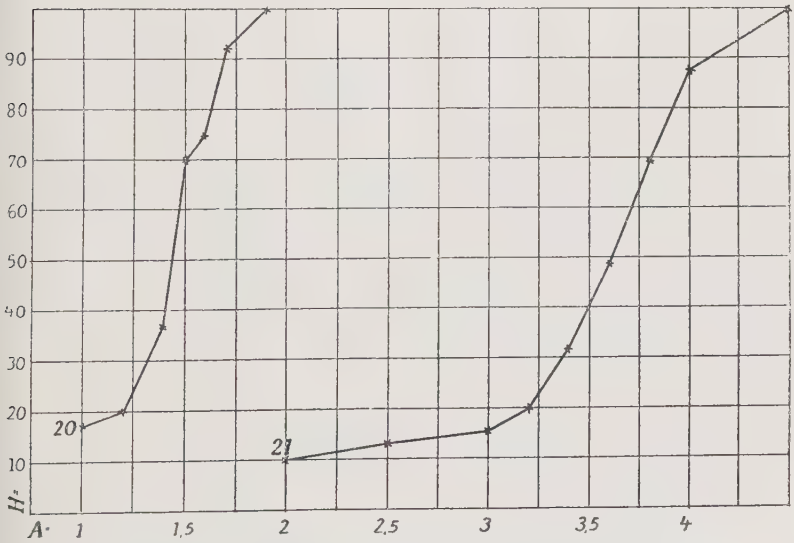

Abb. 2. Die Beeinflussung der Hämolyse durch das Serum.
Blutlösung 20: Serum entfernt.
Blutlösung 21: Serum nicht entfernt.

Tabelle zusammengestellt. *A* gibt an, welche Cyclaminmenge erforderlich war, um 50 %-ige Hämolyse hervorzurufen. *T* bedeutet das Alter der Blutlösung in Tagen. Die durch eine Klammer zusammengefassten Lösungen waren gleichzeitig aus der gleichen Blutmenge ein und desselben Tieres hergestellt. (S. a. Abb. 2.)

Blutlösung	*A*	*T*
16 (serumhaltig) . .	12,5	1
18 (serumfrei) . . .	1,8	1
21 (serumhaltig) . .	3,6	5
20 (serumfrei) . . .	1,45	5
24 (serumhaltig) . .	4,8	1
23 (serumfrei) . . .	1,8	1

Blutlösnng 16 und 18 waren 10-prozentig; 20, 21, 23 und 24 waren 5-prozentig.

Die Beeinflussung der Hämolyse durch das Serum ist also grossen Schwankungen unterworfen.

b) *Die Beeinflussung der Cyclaminhämolyse durch Cholesterinzusatz.*

Die erste hier aufzuführende Versuchsreihe wurde angesetzt, um zu zeigen, dass beim Zusammengeben äquivalenter Mengen Cyclamin und Cholesterin in der Tat nur eine Abschwächung, nicht eine völlige Aufhebung der Giftwirkung des Cyclamins eintritt, und dass ein Ueberschuss von Cholesterin eine weitere Herabsetzung der hämolytischen Wirksamkeit zur Folge hat, ganz im Sinne der Dissoziationshypothese.

A	0	3	3	3	3,6	3,6	3,6	4	4	4
B	0	0	3	6	0	3,6	7,2	0	4	8
H	4	100	12	4	100	49	4	100	90	4

Die verwandte Blutlösung war 5-prozentig, vom Serum befreit, 3 Tage alt.

Die Cholesterinlösung enthielt 0,01 % Cholesterin in 2 prozentigem Alkohol.

Zur Berechnung der Dissoziationskonstante wurden nun eine grössere Anzahl von Versuchen mit verschiedenen Cyclamin- und Cholesterinmengen angesetzt. Die Resultate sind in den folgenden Tabellen zusammengestellt. Die unter k angegebenen Zahlen sind nach der Formel

$$k = \frac{a\,(B - A + a)}{A - a}$$

berechnet.

Versuchsreihe 25.

A	B	H	a	k
(2	0,2	44	1,75	— 0,35)
(2	0,4	31	1,6	0)
(2	0,8	18	1,45	0,7
2	1,2	7	1,3	0 9
2,5	1	56	1,85	1
2,5	1,6	21	1,5	0,9
2,5	1,8	15	1,39	0,9
2,5	2	10	1,35	1
2,5	2,2	6	1,25	0,95
3	2	43	1,75	1,05
3	2,4	28	1,6	1 1
3	2,8	19	1,47	1,2
3	3	10	1,35	1,1
3	3,2	8	1,3	1,15
				Mittel: 1,02

Vergleichsreihe ohne Cholesterin:

A	1,2	1,3	1,4	1,5	1,6	1,7	1,8	1,9	2	2,2
H	3,8	8	15	21	29	38	48	63	84	100

Die Blutlösung war 5-prozentig, 1 Tag alt, vom Serum befreit. Die Cholesterinlösung enthielt 0,01 % Cholesterin in 2 %-igem Alkohol.

Versuchsreihe 27.

A	*B*	*H*	*a*	*k*
(2	0,1	84	1,8	— 0,9)
(2	0,2	68	1,74	— 0,4)
(2	0,4	39	1,6	0)
(2	0,6	37	1,58	0,7)
(2	0,8	27	1,52	1)
2	1	21	1,45	1,2
(2,2	0,4	80	1,8	0)
(2,2	0,8	47	1,64	0,7)
(2,4	0,8	92	1,88	1,0)
2,4	1,2	52	1,65	1,0
2,4	1,6	27	1,5	1,2
2,6	1,2	90	1,87	1,2

Mittel: 1,15

Vergleichsreihe ohne Cholesterin:

A	1,2	1,3	1,4	1,5	1,6	1,7	1,8	1,9	2,0
H	6	14	18	30	33	60	83	93	100

Blutlösung 5-prozentig, 2 Tage alt, Serum entfernt. Cholesterinlösung: 0,01 % Cholesterin in 2 %-igem Alkohol.

Versuchsreihe 7.

A	*B*	*H*	*a*	*k*
2,3	2	45	2,06	15
2,5	2	71	2,26	17
2,3	4	25	1,86	15
2,4	4	36	1,98	17
2,5	4	46	2,06	17
2,6	4	61	2,18	18,5
2,7	4	65	2,2	15
2,8	4	76	2,3	16
2,9	4	90	2,4	17
2,6	6	37	1,98	17

Mittel: 16,5

Vergleichsreihe ohne Cholesterin:

A	1,3	1,5	1,7	1,8	1,9	2	2,14	2,2	2,3	2,4
H	17	20	20	21	31	41	52	68	77	80

Blutlösung 10 %-ig, 7 Tage alt, Serum nur zum Teil (ca. $^6/_7$) entfernt.

Cholesterinlösung: 0,005 % Cholesterin in 1 %-igem Alkohol.

Versuchsreihe 17.

A	*B*	*H*	*á*	*k*
9	5	21	7,2	13
9,5	5	21	7,2	8,5
10,5	5	46	8,4	12
11	5	55	8,9	12
11,5	5	66	9,3	12
12	5	74	9,5	9,5
12,5	5	83	9,9	9
13	5	92	10,3	9
				Mittel: 10,6
11,5	10	11	6,4	6
12	10	22	7,2	8
12,5	10	34	7,8	8,5
13	10	48	8,6	11
13,5	10	61	9,1	12
14	10	72	9,5	12
14,5	10	75	9,6	10
15	10	87	10,1	10,5
				Mittel: 9,8

Vergleichsreihe ohne Cholesterin:

A	0	5	5,5	6	6,5	7	7,5
H	4,5	5	5,5	7,5	12	18	29
A	8	8,5	9	9,5	10	10,5	11
H	38	52	63	69	83	96	100

Blutlösung 10-prozentig, 1 Tag alt, Serum nicht entfernt.

Cholesterinlösung: 0,01 % Cholesterin in 2 %-igem Alkohol.

Versuchsreihe 18.

A	*B*	*H*	*a*	*k*
8	2	12	6,9	6
8,5	2	18	7,5	7,5
9	2	21	7,7	4
9,5	2	30	8,2	4,5
10	2	42	8,9	7
				Mittel: 6
8,5	4	10	6,7	8
9	4	17	7,4	11
9,5	4	24	7,9	12
10	4	28	8,1	9
10,5	4	39	8,7	10,5
				Mittel: 10,5
10	6	17	7,4	10
10,5	6	21	7,7	9
11	6	25	8	8
11,5	6	41	8,9	11,5
12	6	41	8,9	8
12,5	6	56	9,7	11
13	6	63	10,2	12
				Mittel: 10
11	8	19	7,6	10
11,5	8	22	7,8	9
12	8	34	8,4	10
13	8	46	9,1	9,5
				Mittel: 9,5

Vergleichsreihe ohne Cholesterin:

A	0	6	6,5	7	7,5	8	8,5
H	6	7	9	13	19	22	33
A	9	9,5	10	10,5	11	11,5	12
H	42	54	60	67	74	79	88

Dieselben Lösungen wie bei Reihe 17. Blutlösung 3 Tage alt.

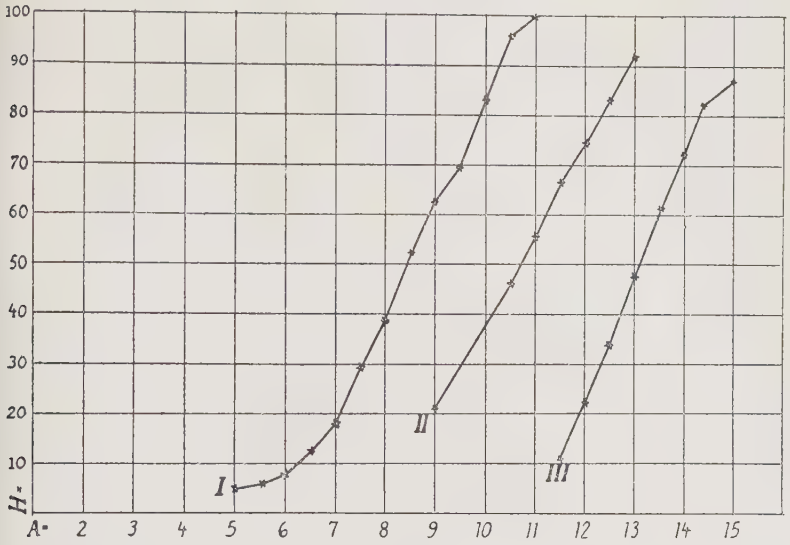

Abb. 3. Die Beeinflussung der Hämolyse durch Cholesterinzusatz in serumhaltiger Blutlösung. (Versuchsreihe 17.)

I. Cyclaminhämolyse ohne Cholesterinzusatz (Vergleichsreihe).
II. Cyclaminhämolyse mit Cholesterinzusatz. $B = 5$.
III. Cyclaminhämolyse mit Cholesterinzusatz. $B = 10$.

VI. Besprechung der Resultate.

Versuchsreihe 25 liefert für k Werte, die man innerhalb unserer Versuchsfehler als konstant ansehen darf. Eine Ausnahme bilden diejenigen Versuche, für die B kleiner als 1 war. Bei ihnen ist k erheblich zu klein; sie verhalten sich also so, als sei für B ein zu kleiner Wert angesetzt. Da bei den übrigen Versuchen der Wert für k mit zunehmendem B nicht ansteigt, muss man wohl annehmen, dass bei Verwendung von so kleinen Cholesterinmengen unkontrollierbare Fehlerquellen aus der Blutlösung das Resultat beeinflussen. Es waren bei diesen Versuchen 0,04 ccm oder weniger der 0,01 %-igen Cholesterinlösungen zugesetzt. — Versuchsreihe 27 mit den gleichen Lösungen wie 25 einen Tag später angesetzt, ergab im wesent-

lichen das gleiche Resultat. Das geringe Ansteigen von k mit zunehmender Konzentration der Komplexverbindung in Reihe 25 berechtigt wohl kaum zu dem Schlusse, dass diese selbst hämolytisch wirkt (s. S. 7); man beachte, dass in den späteren Versuchsreihen davon nichts zu merken ist, obwohl dort viel grössere Mengen der Komplexverbindung vorhanden waren.

Die Versuchsreihen 7, 17 und 18 unterscheiden sich von den beiden vorhergehenden dadurch, dass aus den verwandten Blutlösungen das Serum nicht oder nur teilweise entfernt war. Wir erhalten dort für k Zahlen, die sehr viel grösser sind als die aus Reihe 25 und 27 gefundenen. In ein und derselben Versuchsreihe stimmen sie aber wieder innerhalb der Versuchsfehler untereinander überein. Der Grund dafür, dass bei Verwendung verschiedener Blutlösung verschiedene Werte für k erhalten werden, dürfte in der Beeinflussung der Hämolyse durch das Serum zu suchen sein.

Es liegt nahe, die Fähigkeit des Serums, antitoxisch gegen Cyclaminhämolyse zu wirken, seinem Gehalt an freiem Cholesterin zuzuschreiben. Damit stehen indessen unsere Resultate augenscheinlich im Widerspruch. Man müsste unter dieser Annahme in der für die Berechnung von k dienenden Formel den Wert von B um einen konstanten Betrag S vermehren, der der Menge freien Cholesterins in 5 ccm unserer Blutlösung entsprechen würde. a dürfte nicht mehr aus der Vergleichsreihe entnommen werden, da auch diese jetzt Cholesterin enthält. Indessen lassen sich die Werte für a und S aus dem vorhandenen Material auch ohne Benützung der Vergleichsreihe bestimmen. Man hat nur nötig, aus den Ergebnissen einer Versuchsreihe drei Wertepaare für A und B, also etwa A_1B_1, A_2B_2 und A_3B_3 so zu interpolieren, dass man für jedes den gleichen Hämolysegrad (also etwa 50 %) erhält. Dann besteht die Beziehung

$$k = \frac{a}{A_1 - a}[B_1 + S - (A_1 - a)]$$

$$k = \frac{a}{A_2 - a}[B_2 + S - (A_2 - a)]$$

$$k = \frac{a}{A_3 - a}[B_3 + S - (A_3 - a)]$$

worin k und a stets denselben Wert haben. Durch Umrechnung erhält man daraus

$$a = \frac{\frac{A_1B_2 - A_2B_1}{A_2 - A_1} - \frac{A_1B_3 - A_3B_1}{A_3 - A_1}}{\frac{B_2 - B_1}{A_2 - A_1} - \frac{B_3 - B_1}{A_3 - A_1}}$$

$$S = \frac{B_2(A_1 - a) - B_1(A_2 - a)}{A_2 - A_1}$$

Ich habe ein solches Beispiel durchgerechnet. Aus Reihe 18 ergeben sich für $H = 50\,\%$ die Wertepaare:

$$A_1 = 10{,}3 \qquad B_1 = 2$$
$$A_2 = 11{,}2 \qquad B_2 = 4$$
$$A_3 = 12{,}2 \qquad B_3 = 6$$
$$A_4 = 13 \qquad B_4 = 8.$$

Rechnet man nun S aus, so erhält man negative Werte nahe bei Null ($-2, -2{,}6, -2{,}2$) wodurch wohl die Hinfälligkeit unserer Voraussetzung genügend dargelegt ist. Im Serum vorhandenes freies Cholesterin kann also nicht als Fehlerquelle für uns in Frage kommen.[1]

Dagegen würden unsere Resultate im Einklang mit der Annahme stehen, dass das Serum die Fähigkeit hat, von der jeweils vorhandenen Menge freien Cyclamins einen ihr proportionalen Anteil so zu binden, dass er weder an der Hervorrufung der Hämolyse noch an dem Dissoziationsgleichgewicht teilnehmen kann. a möge wieder diejenige Cyclaminmenge bedeuten, die nicht vom zugesetzten Cholesterin gebunden wird. Von a

[1] Über die Mengen freien Cholesterins im normalen Serum habe ich Angaben in der Literatur nicht finden können. Nach den Arbeiten von DORÉE, FRASER und GARDNER (Procedings of Royal Soc. Vol. *81*, 110 und 230) erscheint verfüttertes Cholesterin z. T. im Blut wieder und zwar im Serum, dessen antihämolytische Kraft bedeutend erhöht wird. Damit stehen unsere Resultate nicht im Widerspruch, wir müssen aber annehmen, dass der Gehalt des normalen Serums an freiem Cholesterin so gering ist, dass er für uns nicht in Betracht kommt, und dass die antihämolytische Fähigkeit des normalen Serums in erster Linie auf die Anwesenheit eines anderen Stoffes zurückzuführen ist.

soll jetzt noch der n-te Teil »freies Cyclamin» bleiben, der Rest wird vom Serum gebunden. n wäre dann ein Mass für die Cyclamin bindende Kraft des Serums. In unserem Dissoziationsgleichgewicht ist dann: die Menge des »freien» (d. h. weder vom Cholesterin noch vom Serum gebundenen) Cyclamins $= \frac{a}{n}$, die Menge des an Cholesterin gebundenen Cyclamins nach wie vor $A - a$. Die Reaktionsgleichung nimmt also die Form an:

$$k = \frac{\frac{a}{n}[B - (A - a)]}{A - a}$$

$$n \,.\, k = \frac{a}{A - a}[B - (A - a)]$$

Was wir aus der Vergleichsreihe entnehmen, ist nach wie vor a. n ist für uns nicht direkt bestimmbar. Es ist umso grösser, je mehr Cyclamin das Serum zu binden imstande ist, und hat für jede Blutlösung einen anderen Wert (Kap. V a). Wir werden also für

$$\frac{a}{A - a}[B - (A - a)]$$

einen umso grösseren Wert erhalten, je grösser die Cyclamin bindende Fähigkeit des in der verwandten Blutlösung befindlichen Serums ist. Für Versuche mit ein und derselben Blutlösung muss er konstant sein, weil dann n konstant ist.

Versuchsreihe 25 und 27 waren mit serumfreier Blutlösung angesetzt; man könnte sagen, dass dann $n = 1$ ist und der für k gefundene Wert die wirkliche Dissoziationskonstante des Cyclamincholesterids bei 37° darstellt (um ihn auf g-Äquivalente zu beziehen, müsste man ihn mit $1{,}29 \times 10^{-8}$ multiplizieren). Er ist nahezu gleich 1; die bei den übrigen Versuchsreihen in letzter Vertikalreihe aufgeführten Zahlen wären dann nicht Werte für k, sondern für n. Man wird wohl aber dem absoluten Wert der Konstanten wenig Bedeutung zumessen.[1] Der Zweck dieser

[1] Offenbar ist die Cyclamin bindende Eigenschaft des Serums an die Anwesenheit eines Stoffes gebunden; denn sie lässt sich ja durch Auswaschen

Arbeit war in erster Linie, zu zeigen, dass auch bei der Entgiftung der Saponine durch Cholesterin Gesetzmässigkeiten vorhanden sind, die mit dem Gesetzt von GULDBERG und WAAGE im Einklang stehen.

Zusammenfassung.

Wenn man äquivalente Mengen Cyclamin und Cholesterin zusammengibt, so erhält man eine Mischung, in der die hämolytische Wirkung des Cyclamins nur zum Teil aufgehoben ist. Ein weiterer Zusatz von Cholesterin bewirkt eine weitere Herabsetzung der Giftigkeit. Diese Tatsachen lassen vermuten, dass die Cyclamin-Cholesterin-Komplexverbindung in Lösung dissoziiert ist. Sieht man die hämolytische Wirkung irgend einer Cyclamin-Cholesterin-Mischung als ein Mass für die vorhandene Menge freien Cyclamins an, so kann man die Dissoziationskonstante k des Cyclamincholesterids berechnen, vorausgesetzt, dass man den Gesamtcyclamingehalt und den Gesamtcholesteringehalt der Mischung kennt.

Man erhält nach dieser Methode für k konstante Werte, solange man die Bestimmungen mit ein und derselben Blutlösung ausführt. Dass man bei Verwendung verschiedener Blutlösungen verschiedene Werte für k erhält, ist wahrscheinlich auf die Anwesenheit des Serums zurückzuführen. Das Serum hat die Fähigkeit, die hämolytische Wirkung des Cyclamins herabzusetzen und diese Fähigkeit ist von Blutlösung zu Blutlösung grossen Schwankungen unterworfen.

herabsetzen. Wir haben aber keine Gewähr dafür, wie weit uns das gelingt, und ob nicht (vielleicht infolge von Adsorption) doch ein erheblicher Anteil davon zurückbleibt.

Die Untersuchungen zu dieser Arbeit wurden teils im Chemischen Laboratorium der naturwissenschaftlich-mathematischen Fakultät zu Freiburg i/B, teils im physikalisch-chemischen Institut der Nobelstiftung zu Stockholm ausgeführt. Den Direktoren dieser beiden Institute, Herrn Prof. Dr. L. GATTERMANN und Herrn Prof. Dr. S. ARRHENIUS sei für ihr freundliches Entgegenkommen hiermit bestens gedankt.

Besonderen Dank schulde ich Herrn Prof. Dr. E. H. RIESENFELD (Freiburg) für die Anregung zu dieser Arbeit und für seine stetige Mitarbeit während ihrer ganzen Dauer.

Tryckt den 7 maj 1913.

Uppsala 1913. Almqvist & Wiksells Boktryckeri-A.-B.

Uppsala 1913. Almqvist & Wiksells Buchdruckeri-A.-G.